

⑫公表特許公報 (A)

平5-505179

⑬公表 平成5年(1993)8月5日

⑤Int.Cl. ⁵ C 07 K 15/06 3/20	識別記号	序内整理番号 8619-4H 7731-4H 8931-4B	審査請求未請求 予備審査請求有	部門(区分) 3 (2)
		C 12 N 15/00		C※

(全8頁)

④発明の名称 新規フィプロネクチンレセプター

④特 願 平3-502972

④④出 願 平3(1991)1月2日

④翻訳文提出日 平4(1992)7月3日

④国際出願 PCT/US91/00048

④国際公開番号 WO91/09874

④国際公開日 平3(1991)7月11日

優先権主張 ④1990年1月5日④米国(US)④461,349

④発明者 ルオスラーティ, エルキ アイ。 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92067 ランチョ サンタ フ

④出願人 ラ ホヤ キャンサー リサー チ ファウンデーション アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037 ラ ホヤ, ノース ト

④代理人 弁理士 山本 秀策

④指定国 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C A, C H(広域特許), D E(広域特許), D K(広域特許), E S(広域特許), F R(広域特許), G B(広域特許), G R(広域特許), I T(広域特許), J P, K R, L U(広域特許), N L(広域特許), N O, S E(広域特許)

最終頁に続く

請求の範囲

方法。

1. サブユニット α 、および β 、またはそれらの免疫学的等価物を包含する、実質的に純粋な活性インテグリン。6. α 、 β インテグリンに対するリガンドの存在を検出する方法であって、該リガンドを含有する疑いのあるサンプルに α 、 β インテグリンを接触させる工程、および、インテグリンに対する該リガンドの結合を検出する工程、を包含する方法。

2. フィプロネクチンおよびG R G D S P Kと結合し、ピトロネクチンとは検出され得るほどには結合しないことによりさらに特徴付けられる、クレーム1に記載の実質的に純粋な活性インテグリンのレセプター。

3. α 、 β インテグリンを単離する方法であって、細胞または組織抽出物を分画する工程、該物質をG R G D S P Kを含むカラムに通す工程、および、カラム上に保持された物質を溶出する工程、を包含する方法。4. α 、 β インテグリンを単離する方法であって、細胞または組織抽出物をフィプロネクチンを含むカラムで分画する工程、および、カラム上に保持された物質を溶出する工程、を包含し、該溶出物が該インテグリンを含んでいる、方法。5. α 、 β インテグリンの存在を検出する方法であって、該インテグリンを含有する疑いのあるサンプルに α 、および β 、サブユニットに対する抗体を接触させる工程、および、該サブユニットに対する抗体の結合を検出する工程、を包含する

明細書

新規フィブロネクチンレセプター

発明の背景

本発明は接着ペプチドのレセプターに関し、さらに詳細には、フィブロネクチンに親和性を有する新規のレセプターに関する。

多細胞生物、例えばヒトは、およそ 10^{14} 個の細胞を有し、この細胞は、例えば血液細胞および神経細胞のような、少なくとも50の異なるタイプに分けられる。細胞は成長ならびに発達の過程で、他の細胞または細胞外の物質に、特異的かつ、規則的な方法で結合する。そのような細胞接着のメカニズムは、細胞の成長、移動および分化のパターンを仲介する際に重要であるようである。細胞接着メカニズムによって、細胞は特殊化した特徴、例えば筋肉細胞または肝細胞として機能するように、発達することができる。細胞接着のメカニズムはまた、脱分化および侵入に、特に、細胞が細胞自身の特殊化した形態を失い、転移ガン細胞になる場合にも、関連する。

細胞同志間の、および細胞と細胞外マトリックスとの相互作用に関するメカニズムは、十分に理解されていない。しかし、細胞表面上のまたは細胞外マトリックス内の同種のリガンドを特異的に認識し、このリガンドに結合する、細胞表面レセプターによって、仲介されると考えられている。

細胞外マトリックスに対する細胞接着およびマトリックス上への細胞の転移は、多くの場合、マトリックススタンパク質中のArg-Gly-Asp含有配列への細胞表面レセプターの結合により仲介される (RuoslahtiおよびPierschbacher, Science 238:491 (1987) に総説されている)。Arg-Gly-Asp配列は、少なくともフィブロネクチン、ピトロネクチン、種々のコラーゲン、ラミニンおよびテネイシン中では、細胞接触部位である。細胞接触部位が類似しているにもかかわらず、これらのタンパク質は、特異的なレセプターによって個々に認識され得る。

インテグリンは、Arg-Gly-Asp結合部位を介して細胞外マトリックス膜タンパク質のArg-Gly-Asp結合部位と結合する接着レセプターのファミリーである。これらは、1つの(α)および1つの(β)サブユニットからなる、ヘトロダイマー分子である。それぞれの種類にはいくつかのサブユニットが知られており、種々のαβの組み合せは、異なるリガンド特異性を持つレセプターを形成する。

これまでには、11個の区別可能なα種が、報告されている。以前は、これらは、結び付くβサブユニットに基づき、3つの主要ファミリーに分けられていた。β₁サブファミリーは、フィブロネクチン、種々のコラーゲン、ラミニンおよびテネイシンのレセプターを含む。β₂のサブファミリーは、白血球特異性レセプターからなり、一方、β₃のサブファミリーは、一般的に、血小板グリコプロテインIIb-IIIaレセプターおよびピトロネクチンレセプターと呼ばれる多重特異的レセプタ

ーを含んでいる。存在する既知の組み合せの中で、α₁サブユニットはβ₁サブユニットと結合し、ピトロネクチンレセプターを形成し、また最近β₁およびβ₃と呼ばれる2つのβサブユニットと結び付くことが報告された。α₁β₁インテグリンは、ピトロネクチンおよびフィブロネクチンレセプターであるが、α₁β₃のリガンド特異性は知られていない。

インテグリンは、正常および異常な細胞プロセスの重要な局面の仲介に重要であるため、異なるインテグリンを同定し、特徴付ける必要がある。本発明は、この必要性を満たし、これに関連する利点を提供するものである。

発明の要約

本発明は、α₁およびβ₁のサブユニットからなることを特徴とする、実質的に純粋なインテグリン型のレセプターを提供する。このα₁β₁インテグリンは、フィブロネクチンおよびGRGDSPKと結合するが、ピトロネクチンとは結合しない。α₁β₁インテグリンは、α₁β₃リガンドの存在を測定するため、および種々のインテグリンに特異的な接着ペプチドを開発するために使用し得る。α₁β₁の存在により、細胞がフィブロネクチンに接着する能力を評価し得る。

図面の簡単な説明

図1は、種々の細胞タイプ上に発現したインテグリンサブユニットを示すゲルの写真である。

図2は、フィブロネクチンおよびピトロネクチンに関する細胞接着アッセイの結果を示す。エラーバーは、3つの独立したアッセイの平均値の標準偏差を示している。

発明の詳細な説明

本発明は、α₁およびβ₁サブユニットまたはそれらの免疫学的等価物からなる、新しいレセプターに関する。このインテグリン型レセプターを、本明細書では「α₁β₁レセプターまたは「α₁β₁インテグリン」と呼ぶ。このα₁β₁レセプターは、図1の左のパネルに示したように、α₁サブユニットに対するモノクローナル抗体で免疫沈降され、そしてβ₁サブユニットの予期される位置にバンドを含んでいる。

上述の免疫沈降の結果が示す、α₁サブユニットとβ₁サブユニットとの会合を確認するために、各サブユニットに対するモノクローナル抗体を使用して繊維芽細胞株 (fibroblast cell line) WI-38からのレセプター複合体を単離した。次に一連の抗体を用いて、同時に単離されたサブユニットを同定した。抗体α₁モノクローナル抗体により精製された物質を、2つの異なる抗体β₁モノクローナル抗体およびβ₁の細胞質領域部位を有するペプチドに対するポリクローナル血清による免疫沈降で精製した。3つの抗体β₁試薬の全てが、α₁含有のインテグリンを認識した。逆に、β₁モノクローナル抗体で得られた物質は、2つの異なる抗体α₁モノクローナル抗体およびβ₁の細胞質領域部位を有するペプチドに対する、ポリクローナル

血清による免疫沈降で精製した。これらのデータは、 α 、および β サブユニットが、確かに複合体を形成し会合していることを示している。

この新しい α 、 β インテグリンのリガンド結合特異性を調べるために、アフィニティクロマトグラフィ実験および細胞接着アッセイを行なった。クロマトグラフィ実験では、¹²⁵IでラベルしたIMR 32 神経芽細胞(neuroblastoma cells)表面の界面活性剤抽出物を、フィブロネクチンおよびGRGDSPKペプチドアフィニティカラムで分画した。この α 、 β インテグリンは、細胞接着部位を含むフィブロネクチンの11Okdフラグメントに結合した。これは、細胞接着部位を有するペプチド(GRGDS)でカラムから抽出したが、関連したペプチドFGRGESPでは溶出しなかった。引き続いてEDTA抽出を行っても、別のバンドは現れなかった。このレセプターはまた、セファロースに結合したペプチドGRGDSPKを含むカラムに結合し、GRGDSペプチドで溶出したが、GEGESPペプチドでは溶出しなかった。

(以下余白)

アミノ酸を、本明細書で示す標準的な一文字の略記号によって表す。

アミノ酸	記号
アラニン	A
アスパラギン酸	D
システイン酸	C
グルタミン	Q
グルタミン酸	E
グリシン	G
ヒスチジン	H
イソロイシン	I
ロイシン	L
リジン	K
メチオニン	M
フェニルアラニン	F
プロリン	P
セリン	S
スレオニン	T
トリプトファン	W
チロシン	Y
バリン	V

抽出された物質が α 、 β 複合体であることを確認するために、各カラムからのピークフラクションをプールし、そして、 α 、および β サブユニットに対するモノクローナル抗体で免疫沈降した。両方の抗体は、各カラムから同じ2つのバンドを沈殿させた。これは、各カラムから特異的に溶出された物質が、実際に α 、 β であったことを示している。

細胞接着アッセイでは、IMR 32細胞はフィブロネクチンに結合するが、ビトロネクチン(図2)またはフィブリノーゲン(図示せず)とは結合しないことが示された。フィブロネクチンに対するこれらの細胞接着は、 α 、 β 複合体によって仲介されるようである。なぜなら、検出された唯一の他のインテグリンである α 、 β は、アフィニティクロマトグラフィ実験で、フィブロネクチンと結合しなかったからである(図1参照)。これらの細胞はまた、おそらく、 α 、 β 複合体の存在によって、コラーゲンIおよびIVおよびラミニンに結合した。

このデータは、 α 、 β インテグリンサブユニットが会合して、機能的なフィブロネクチンレセプターを形成することを示す。多様性のスプライシングの様な変化による分子の不均一性は、完全には把握されていないが、この新しいレセプターのサブユニットは、各サブユニットに対して少なくとも3つの抗体を用いたが、 α 、および β とは、免疫学的に区別できなかった。従って、電気泳動度および免疫学的反応性から判断すると、この新しいレセプターは、 α 、および β サブユ

ニット、またはそれらの免疫学的等価物からなっている。

この新しい α 、 β は、ビトロネクチンとは結合しないが、GRGDSPKカラムで単離し得る。このリガンド結合パターンは、以前特徴付けられたインテグリンのいずれのとも違うようである。GRGDSPKカラムと結合するこのレセプターの能力は、2つのビトロネクチン結合インテグリン、 α 、 β (Pytelaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5766 (1985))および血小板レセプター α 、 β (Pytelaら、Science 231:1559 (1986))(およびその中の引例)これらの文献は本明細書では参考として援用される)と共有される特性である。 α と最近報告された β サブユニットとの複合体もまた、このグループに属し得る(Freedら、EMBO 8:2955 (1989)、本明細書では参考として援用される)。また別の最近報告された α 、(α 、 β)の複合体は、フィブロネクチンおよびビトロネクチン(Cbereshら、Cell 57:59 (1989)、本明細書では参考として援用される)の両方と結合する。

β クラス(α 、 β)のフィブロネクチン結合インテグリンは、ビトロネクチンに結合せず、ここに記載した α 、 β インテグリンとは異なり検出されるほどにはGRGDSPKカラムと結合しない。そのため、 α 、 β 複合体は、ビトロネクチン結合インテグリンおよび β クラスインテグリンの間の明確な中間特異性を有しているようである。

3つの異なる α サブユニットが、1つ以上の β サブユニットと会合することが示された。これらのうちの2つ、 α 、およ

BORATORY MANUAL (Barlow and Cole, 編) Cold Spring Harbor Laboratory (1988) を参照されたい。

また、 α, β_1 レセプターは、インテグリンのリガンドの分析の分野でも有用である。そのようなリガンドの特異性は重要である。例えば、血小板インテグリン gp IIb/IIIa と結合するがその他のインテグリンとは結合しない、RGD配列を有する合成ペプチドが、抗血小板剤として開発されている。

α, β_1 インテグリンと相互作用する化合物の能力は、実施例 II に記載したように、アフィニティクロマトグラフィーによって評価し得る。試験細胞が有する他のインテグリンの寄与が排除できるならば、細胞接着アッセイは実施例 III に記載したように使用され得る。最後に、酵素イムノアッセイフォーマットまたは放射線レセプターアッセイを、Hautanen ら, J. Biol. Chem. 264:1347-1442 (1989); Gehlsen ら, J. Biol. Chem. 264:19034-19038 (1989) に記載のように使用し得る。

以下の実施例は例示を目的としており、本発明の制限を意図するものではない。

実施例 I

α, β_1 インテグリンの同定

インテグリンサブユニットに対する抗体を、以下の表に示すように調製した。

表 I

サブユニット	宿主	モノクローナル または ポリクローナル	免疫原	参考文献または確認法
α_1	マウス	モノクローナル Mab 147	構造型ビトロネクチン レセプター	イムノプロット法: α_1 サブユニットと反応
α_2	マウス	Mab 59	構造型ビトロネクチン レセプター	イムノプロット法: α_2 サブユニットと反応
β_1	ウサギ	ポリクローナル	E K R V R P P P Q Q E E - Q E R E Q L Q Q P H - E N G E G N S E T	Freed ら, EMBO J. 8:2955 (1989)
β_2	ウサギ	ポリクローナル	E K A Q L K P - P A T S D A	イムノプロット法: α_2 サブユニットと反応
α_3	マウス	モノクローナル Go83	α_3	Sonneberg ら, J. Biol. Chem. 263:14030 (1988)
α_4	マウス	モノクローナル P105	α_4	Wagner and Carter J. Cell Biol. 103:1073 (1987)
α_5	ウサギ	ポリクローナル	α_5 サブユニットの 細胞質ドメイン	Synes ら, J. Cell Biol. 105:409 (1989)
β_3	ウサギ	ポリクローナル	K K K E K E K E K M N - A K W D T G E N P - I Y S A V T T V V - N P K Y E G K	イムノプロット法: β_3 サブユニットと反応
β_4	マウス	モノクローナル LM 534 LM 442	構造型フィブロネクチン レセプター	イムノプロット法: β_4 サブユニットと反応

(以下 余白)

ヒトの神経芽細胞 (Human neuroblastoma cells) (IMR 32; ATCC 受託番号 CCL 127)、肺細胞癌細胞 (lung cell fibroblasts) (WI-38; ATCC 受託番号 CCL 75)、例えば、(WI-38; ATCC 受託番号 CCL 75) およびグリア芽細胞腫細胞 (glioblastoma cells) (U251) は、本明細書では参考として援用する Pytelia ら, Cell 40:191-198 (1985) による ¹²⁵I およびラクトベルオキシダーゼで表面をラベルし、これを 0.5% トリトン X-100、150mM NaCl、1 μ g/ml ロイペプチド、1 mg/ml アプロテニン、0.4 μ g/ml ベプスタチンおよび 1.0 mM トリス、pH 7.2 を含む緩衝液で抽出した。インテグリンヘテロダイマーを、この β_1 または α サブユニットのいずれかに特異的な抗体で免疫沈降させ、SDS-PAGE によって分析した。簡潔に述べると、この抽出物を、15,000rpm で遠心分離し、免疫前のラビットまたはマウス IgG-セファロースとともにインキュベートしてあらかじめ沈降させた。1 次抗体とのインキュベーション後、免疫複合体を、セファロース-プロテイン A またはセファロース-ヤギ抗マウス IgG のいずれかで明らかにした。

α_1 含有インテグリンおよび β_1 含有インテグリンを、それぞれ抗 α_1 (Mab 147) および抗 β_1 (Mab LM 534) セファロースカラムで、WI-38 抽出物から免疫精製した。このカラムを、0.5% トリトン X-100 含有の 50mM グリシン-HCl pH 3 で抽出した。中和の後、この物質を、抗 β_1 抗体または抗 α_1 抗体を用いる免疫沈降用に 3 つに分け、この免疫沈降物を、SD

S-PAGEによって、実質的に上述のよう分析した。それぞれの場合、 α 、および β サブユニットの間の会合が見られた。

実施例 II

α 、 β サブユニットの

リガンド特異性の分析および精製

IMR 32細胞を、表面を 125 Iでラベルし、200mM オクチルグルコシド、150mM NaCl、1 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂、1 mM MnCl₂、1 μ g/mlロイペプチド、1 μ g/mlアプロチニン、0.4 μ g/mlペプチダーゼおよび10mMトリス、pH7.2中で溶解した。この細胞抽出物を、110 kDフィブロネクチンフラグメントーセファロースカラムにかけ、このカラムを50mMオクチルグルコシド、1 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂、1 mM MnCl₂、150mM NaCl、および10mMトリス、pH7.2、単独で、および1 mg/ml G R G E S Pペプチドと共に洗浄した。このカラムを1 mg/ml G R G D S Pペプチドで抽出し、その後、10mM EDTAで抽出した。IMR 32細胞抽出物もまた、同じ方法で G R G D S P Kカラムで分画した。

これらの工程は、本明細書では参考として援用するPytelら、Meth. Enzymol. 144:475-489 (1987)；およびGailitおよびRuoslahti、J. Biol. Chem. 263:12927-12932 (1988)に記載されている工程と類似している。各カラムからの抽出物は、

解されるべきである。従って、本発明は、以下の特許請求の範囲よってのみ限定される。

特表平5-505179 (5)

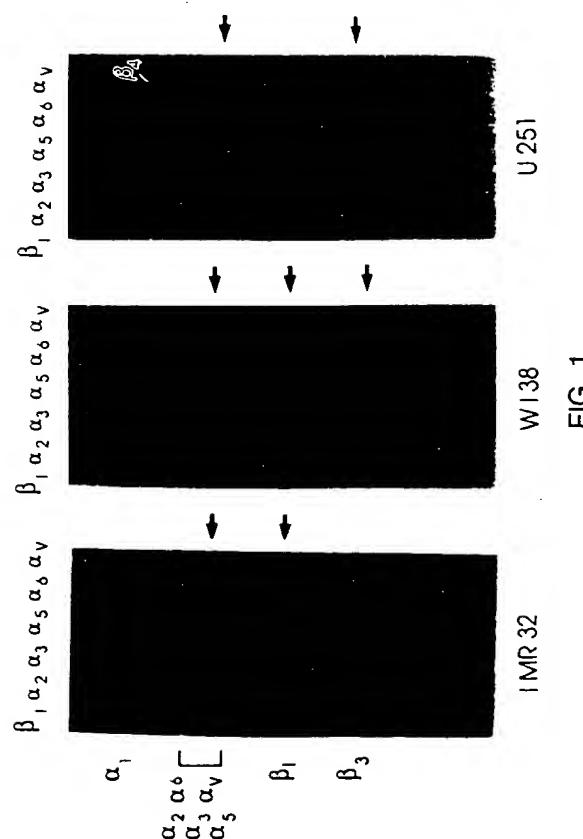
1つの α および1つの β ユニットを有するインテグリンを含んでいた。そのピークの割合をブールし、実施例 I に記載されている抗 β_1 (Mab LM 534) または抗 α_v (Mab 147) で、免疫沈降させた。このカラムに結合したインテグリンは、抗 α_v および抗 β_1 の両方で沈降することがわかった。これは、 α_v および β_1 サブユニットの会合を示している。

実施例 III

細胞粘着アッセイ

マイクロタイタブレートを、種々の濃度のフィブロネクチンおよびビトロネクチンでコートし、0.05%ウシ血清アルブミンでさらにコートした。洗浄した後、IMR 32 (ヒト神経芽細胞；ATCC CCL 127) またはMG-63 (ヒト骨肉腫；ATCC CCL 1427) 細胞をウェル当たり約10⁵ブレートし、90分間37°Cでインキュベートした。この接着した細胞を、3%パラホルムアルデヒドで固定し、0.5%クリスタルバイオレッドで染色した。この接着物を、600nmの吸光度を読むことにより、定量した。図2に示すように、IMR 32細胞は、フィブロネクチンに接着し、ビトロネクチンまたはフィブリノーゲンには接着しなかったが、MG-63細胞は、3つのすべての基質に結合した。

本発明は好ましい実施態様を用いて記述されたが、種々の改変が、本発明の意図を変えることなくなされ得ることが理



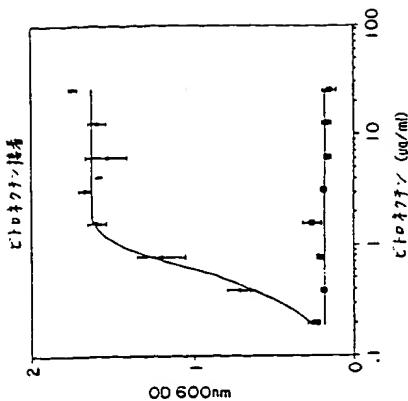


FIG. 2B

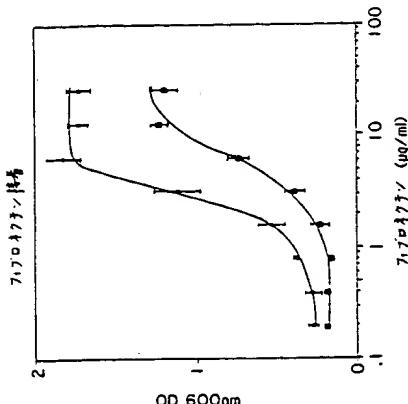


FIG. 2A

本発明は、 α 、および β 、サブユニットからなることを特徴とする実質的に純粋な活性インテグリンを提供する。そのレセプターは、フィブロネクチンおよびG R G D S P Kと結合し、ピトロネクチンとは結合しない。 α 、 β 、レセプターは、フィブロネクチンの存在を測定するために使用し得る。

補正書の写し（翻訳文）提出書（特許法第184条の8）

請求の範囲

平成4年7月3日

特許庁長官殿

1. 特許出願の表示

PCT/US91/00048

2. 発明の名称

新規フィブロネクチンレセプター

3. 特許出願人

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037

ラホヤ、ノース トレイ バインズ ロード
10901名称 ラホヤ キャンサー リサーチ
ファウンデーション

4. 代理人

住所 〒540 大阪府大阪市中央区城見一丁目2番27号

クリスタルタワー13階

氏名 (7828) 弁理士 山本秀策

電話 (大阪) 06-949-3910

5. 補正書の提出年月日

1991年12月13日

6. 添付書類の目録

(1)補正書の写し（翻訳文）



1通

1. サブユニット α 、および β 、またはそれらの免疫学的等価物を包含する、実質的に純粋な活性インテグリン。

2. フィブロネクチンおよびG R G D S P Kと結合し、ピトロネクチンとは検出され得るほどには結合しないことによりさらに特徴付けられる、クレーム1に記載の実質的に純粋な活性インテグリンのレセプター。

3. α 、 β 、インテグリンを単離する方法であって、細胞または組織抽出物を分画する工程、該物質をG R G D S P Kを含むカラムに通す工程、カラム上に保持された物質を溶出する工程、および、 α 、 β 、インテグリンを該溶出した物質から分離する工程、を包含する方法。

4. α 、 β 、インテグリンを単離する方法であって、細胞または組織抽出物をフィブロネクチンを含むカラムで分画する工程、カラム上に保持された物質を溶出し、該溶出物が該インテグリンを含んでいる工程、および α 、 β 、インテグリンを該溶出した物質から分離する工程、を包含する方法。

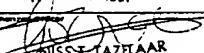
5. α 、 β 、インテグリンの存在を検出する方法であって、該インテグリンを含むする疑いのあるサンプルに α 、および β 、

国際通告

サブユニットに対する抗体を接触させる工程、および、該サブユニットに対する抗体の結合を検出する工程、を包含する方法。

6. α, β ; インテグリンに対するリガンドの存在を検出する方法であって、該リガンドを含有する疑いのあるサンプルに α, β ; インテグリンを接触させる工程、および、インテグリンに対する該リガンドの結合を検出する工程、を包含する方法。

International Application No. PCT/US 91/00048

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classifications numbers apply, indicate all)			
According to International Patent Classification (IPC) or to both International Classification and IPC			
IPC5: C 07 K 15/06			
II. FIELDS SEARCHED			
Minimum Documentation Searched*			
Classification System			
IPC5	C 07 K		
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documentation is included in Fields Searched*			
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*			
Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No. *	
P,X	Dialog Information Services, File 154: Medline 85-91, Dialog accession no. 07295850, Bodary SC et al: "The integrin beta 1 "subunit" associates with the vitronectin receptor alpha v, "subunit" to form a novel vitronectin receptor in a human embryonic kidney cell line", & J Biol Chem Apr 15 1990, 265 (11) p5938-41	1,3-6	
P,X	Dialog Information Services, File 55: Biosis 85-91, Dialog accession no. 7670156, Dedhar S et al: "Isolation of a novel integrin receptor mediating arg-gly-asp-directed cell adhesion to fibronectin and type I collagen from human neuroblastoma cells association of a novel beta-1-related subunit with alpha-v", & J Cell Biol 110 (6), 1990, 2185-2194	1,3-6	
* Special categories of cited documents**			
** later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the conception but which may be of interest in view of the procedure or theory underlying the invention			
*† earlier documents not published on or after the international filing date			
*‡ document which may have bearing on priority claimed or which may be of interest in view of the procedure or theory underlying the invention			
*§ document referring to an art disclosure, use, exhibition or other source of information which may be of interest in view of the conception or other special reason (no abstract)			
*¶ document published prior to the international filing date but which may be of interest in view of the procedure or theory underlying the invention			
*# document member of the same patent family			
IV. CERTIFICATION		Date of the Actual Commencement of the International Search	Date of Mailing of the International Search Report
		22nd April 1991	14 MAY 1991
International Searching Authority		Signature of Authority Representative	
EUROPEAN PATENT OFFICE			

International Application No. PCT/US 91/00048

II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
P,A	Dialog Information Services, File 154: Medline 85-91, Dialog accession no. 07516653, Joseph LB et al: "Characterization of Chinese hamster ovary cells with impaired spreading properties on fibronectin", & J Cell Sci (ENGLAND) Jul 1990, 96 (Pt 3) p519-26	1-6
A	Science, vol. 238, October 1987, Erkki Ruoslahti et al.: "New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins", see page 491 - page 497 the whole article	1-6
A	Nature, vol. 309, May 1984, Michael D. Pierschbacher et al.: "Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule", see page 30 - page 33 the whole article	1-6
	-----	-----

第1頁の続き

⑤Int. Cl. 5	識別記号	庁内整理番号
C 12 P 21/00	A	8214-4B
G 01 N 33/53	V	8310-2J
// C 12 N 15/06		
C 12 P 21/08		8214-4B
(C 12 P 21/00		
C 12 R 1:91)		
(C 12 P 21/08		
C 12 R 1:91)		

⑥発明者 タロネ, グイド	イタリア国 トリノ 10100 ストラーダ デル カンテーロ 9 /2
⑥発明者 ジヤンコツティ, フィリポ ジ	アメリカ合衆国 カリフォルニア 92014 デル マール, フォー ス ストリート 201
⑥発明者 ボーゲル, ブルース イー.	アメリカ合衆国 カリフォルニア 92122 サン デイエゴ, アバ ートメント 72 デコロ ストリート 4178